

## Résumé

Les observations réalisées par le Cirad sur les hybrides naturels de caféiers entre *C. arabica* et *C. canephora* de Nouvelle-Calédonie, de 1995 à 1998, ont permis de les évaluer aux plans biologique et agronomique. Les mesures agronomiques ont concerné la croissance, le développement végétatif et la caractérisation foliaire des hybrides. Les observations biologiques ont porté sur le niveau de ploïdie, la fertilité et le potentiel de production. La nature hybride de ce matériel végétal a été confirmée et une première classification a été réalisée. Les résultats obtenus montrent que le niveau de ploïdie influence fortement la plupart des variables observées.

## Abstract

Observations made by CIRAD from 1995 to 1998 on wild coffee hybrids between *C. arabica* and *C. canephora* in New Caledonia enabled their biological and agronomic evaluation. Agronomic assessments included growth, vegetative development and leaf characterization, whilst biological observations concerned the level of ploidy, fertility and production potential. The hybrid nature of this planting material was confirmed and a preliminary classification established. The results obtained showed that the level of ploidy had a significant effect on most of the variables observed.

# Caractérisation et évaluation des hybrides naturels de caféiers de Nouvelle-Calédonie

Jagoret P., Cilas C., Eskes A., Charmetant P.

CIRAD-CP, TA 80/PS1, avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

La Nouvelle-Calédonie produit du café depuis la fin du XIX<sup>e</sup> siècle. La première espèce de caféier, introduite en 1856, a été *C. arabica*. Son développement cessa à partir de 1908 lorsque la rouille orangée, due à *Hemileia vastatrix*, a fait son apparition sur l'île (Saussol, 1967). Sensibles à cette maladie, les variétés diffusées à l'époque : Typica, Laurina (Bourbon Pointu) et Mokka (Leroy) (Coste, 1955 ; Saussol, 1967), ont été alors progressivement remplacées par des caféiers de l'espèce *C. canephora*, variété Kouillou, importés de France en 1910, et variété Robusta, importés de Java en 1912 (Risbec, 1930).

Une sélection naturelle des plants, due à l'hétérogénéité génétique des populations, a cependant permis à *C. arabica* de ne pas disparaître totalement (Boccas *et al.*, 1981 ; Pellegrin *et al.*, 1983). Les producteurs ont pu conserver une partie de leurs caféiers (Tercinier, 1958 ; Saussol, 1967), issus probablement des variétés Typica et Bourbon (Eskes, 1990). Les plantations mixtes obtenues favorisèrent les croisements spontanés entre les deux espèces, phénomène rare mais déjà observé dans d'autres pays où des hybrides spontanés tétraploïdes, tel l'hybride de Timor, ont été observés dans les années 50 et largement utilisés pour l'amélioration de *C. arabica* (Coste, 1989 ; Charrier *et al.*, 1997).

L'hybridation artificielle entre *C. arabica* (44 chromosomes) et *C. canephora* (22 chromosomes) est possible en utilisant *C. arabica* comme parent femelle. De ce type de croisement résultent des hybrides triploïdes (33 chromosomes), vigoureux mais presque stériles. Des hybrides tétraploïdes ont été néanmoins obtenus et exploités, comme l'Arabusta en Côte d'Ivoire, par duplication artificielle du nombre de chromosomes de *C. canephora*, avant de réaliser les croisements interspécifiques (Capot *et al.*, 1968). Une duplication naturelle des chromosomes est également possible si des cellules mères de pollen de caféiers sont soumises à un traitement par le froid (Lanaud, 1983).

L'apparition d'hybrides interspécifiques spontanés en Nouvelle-Calédonie a été favorisée par l'écosystème local propice à leur développement – culture sous ombrage, humidité permanente dans les vallées de la chaîne centrale, manque d'entretien – dû aux conditions climatiques et humaines particulières de l'archipel : saison fraîche plus marquée sur la côte ouest, désintérêt des producteurs pour la caféiculture.

La conjonction de ces facteurs a permis la croissance et la reproduction des hybrides obtenus naturellement, et dont les caractéristiques de résistance à la rouille, de grande vigueur mais de faible produc-

tion n'ont pas échappé aux producteurs qui les ont appelés « cafés métis ».

Compte tenu de l'intérêt scientifique que pouvait présenter ce type de matériel végétal, le Cirad a effectué des collectes à partir de 1985 (Anon., 1986) et, en association avec l'Orstom (devenu Ird), il a réalisé en 1991 une prospection (Charmetant et Le Pierres, 1991). En 1993, après multiplication des hybrides par bouturage, ce programme a abouti à la création d'une collection de 84 génotypes à la station de Pocquereux. Ceux-ci ont été évalués, jusqu'en 1998, aux plans agronomique et biologique.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Les hybrides interspécifiques naturels de caféiers cultivés ont été récoltés dans des plantations âgées, datant surtout de l'entre-deux-guerres, où *C. arabica* est planté en mélange avec *C. canephora*. Ils sont issus de 19 zones géographiques situées principalement dans la région centrale de la Nouvelle-Calédonie, plus propice que le Nord (absence de *C. arabica*) et le Sud (absence de *C. canephora*) à l'apparition d'hybrides interspécifiques (carte). Ces hybrides sont comparés à cinq témoins : une variété Sarchimor (1668), trois variétés Catimor (F5, F6 et 1702), et un clone de *C. canephora* (Jagoret, 1997).

### Dispositif au champ

Située sur la côte ouest de la Nouvelle-Calédonie, côte sous le vent, par 166° 53' de longitude est et 21° 44' de latitude sud, à une altitude de 38 m, la station de Pocquereux connaît de ce fait un régime pluviométrique régulièrement déficitaire, moins de 1 200 mm de précipitations annuelles, qui implique le recours à l'irrigation en période sèche. Les sols sont argilo-limoneux et rendent nécessaire la plantation des caféiers sur billons. Hyper-magnésiens, ils sont caractérisés par une acidité marquée (pH eau = 5), et une forte déficience en potasse et en phosphore. Une fumure minérale calculée à l'aide du logiciel diagnostic-sol est apportée aux caféiers à raison de deux épandages par an.

Chaque génotype est représenté par une ligne de quatre à six pieds. La densité de plantation des caféiers est de 2 500 plants par hectare. Ils sont conduits sans ombrage, en croissance libre, en laissant deux tiges par pied.

### Observations réalisées

Le nombre de plants observés par génotype varie de un à six selon l'effectif planté à l'origine et les mortalités survenues en deux ans. Le niveau de ploïdie, le développement végétatif, la fertilité, le potentiel de production et la résistance à *Hemileia vastatrix* sont observés sur l'ensemble de la collection.

### Niveau de ploïdie

Le niveau de ploïdie est estimé par la technique de cytométrie en flux, c'est-à-dire par l'intensité de fluorescence, proportionnelle à la quantité d'ADN contenue dans les cellules (Ollitrault et Michaux-Ferrière, 1992). Les mesures sont réalisées au laboratoire de l'Inserm à Montpellier. Les hybrides interspécifiques sont comparés à deux témoins : CAN 126 (diploïde) et KF2.1 (tétraploïde).

### Vigueur et développement végétatif

Pour estimer la croissance des hybrides naturels, on mesure la circonférence du tronc à 1 an et à 2 ans, à 10 cm du sol, et on calcule l'accroissement du diamètre au collet entre 1 et 2 ans.

Leur développement végétatif est évalué en mesurant la plus haute tige et un rameau primaire plagiotrope dont on a compté les nœuds afin de calculer la longueur des entre-nœuds.

Leur encombrement est apprécié en mesurant le diamètre de la canopée à 2 ans.

Enfin, les largeurs (l) et les longueurs (L) de 30 feuilles par génotype ont été mesurées pour estimer leur surface (L x l) et déterminer leur forme (L / l).

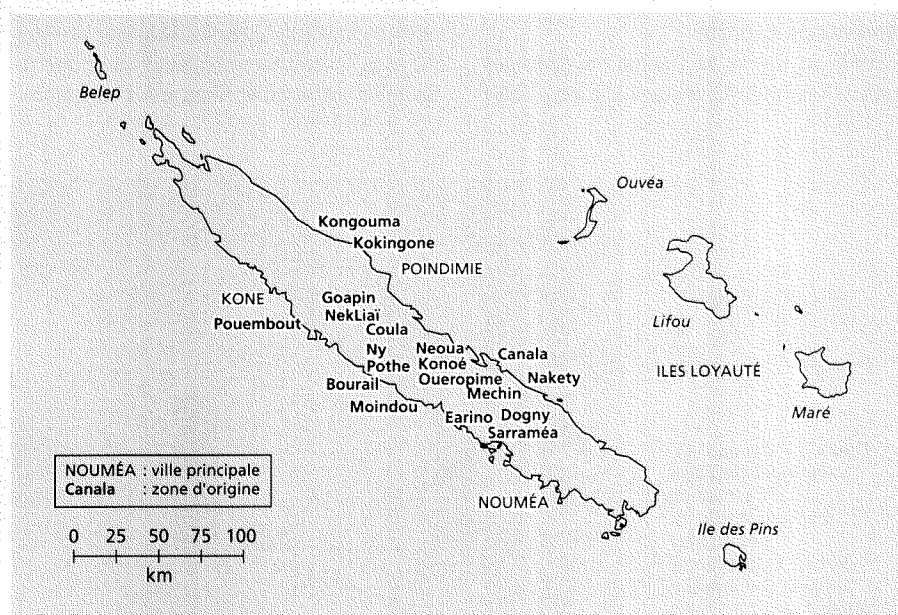
### Fertilité

La fertilité est étudiée en condition de pollinisation naturelle. Bien que le taux de réussite observé en autofécondation ne soit pas connu pour tous les hybrides, il varie cependant de 0 % à 95 % ce qui est comparable au taux de réussite en pollinisation libre.

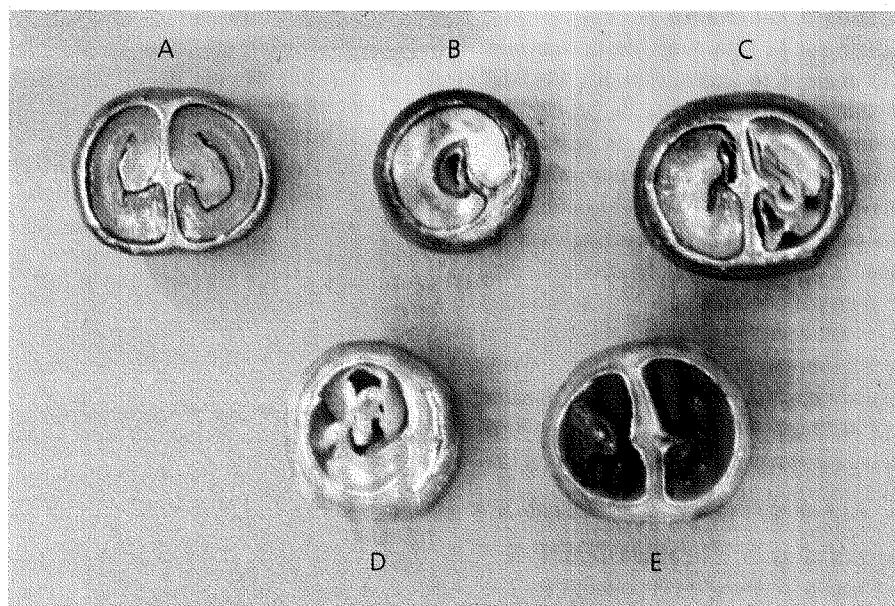
La fertilité femelle de chaque génotype est estimée par la coupe de 100 à 120 cerises immatures afin de les classer en fonction de leur contenu (Reffye, 1974) (photo 1). Le coefficient de remplissage, ou nombre de grains formés par cerise, le taux de loges vides et le taux de grains caracolis par rapport au nombre de grains formés, sont calculés.

La fertilité mâle est estimée par comptage et classification d'au moins 30 grains de pollen par génotype, après coloration au bleu d'Alexander. Après montage des lames, le pollen fertile apparaît en rouge violacé et le pollen stérile en vert (Jahier, 1992).

Localisation des zones d'origine des hybrides naturels de caféiers de Nouvelle-Calédonie.  
Location of zones of origin of New Caledonian wild coffee hybrids.







S. Lebegin

**Photo 1.** Les différents types morphologiques de fruit du caféier. / *Different coffee fruit morphological types.*

De gauche à droite et de bas en haut :  
From left to right and bottom to top:

A : cerise à deux grains normaux / cherry with two normal beans.

B : cerise à un grain caracoli et une écale / cherry with one pea berry and one shell.

C : cerise à un grain normal et une loge vide / cherry with one normal bean and one empty cavity.

D : cerise à une loge vide et une écale / cherry with one empty cavity and one shell.

E : cerise à deux loges vides / cherry with two empty cavities.

### Potentiel de production

De 1996 à 1998, la production des arbres des différents génotypes est notée individuellement. Cette notation s'échelonne de 0 (aucun fruit sur l'arbre) à 5 (arbre très chargé).

### Résistance à *Hemileia vastatrix*

En collaboration avec l'Orstom, la résistance des hybrides naturels à la race d'*Hemileia vastatrix* présente en Nouvelle-Calédonie (Boccas *et al.*, 1985) est observée en juin et juillet 1996, au moment où l'incidence de la maladie est la plus élevée.

Trois boutures plagiotropes par hybride, chacune avec deux paires de feuilles, sont placées en milieu confiné dans trois bacs de bouturage sous ombrière, chacun correspondant à une répétition. L'inoculation des feuilles est réalisée par frottement de leur face inférieure avec des feuilles présentant des taches de rouille orangée, fraîchement récoltées sur des parcelles de caféier Arabica, suivi de leur humidification par atomisation. Après inoculation, le matériel végétal est maintenu quatre jours dans des conditions d'obscurité totale et d'humidité saturante afin de favoriser la germination des urédospores.

La lecture des réactions est réalisée six semaines plus tard. Elle confirme la résistance (absence de taches de sensibilité à la rouille orangée sur les trois boutures) ou la sensibilité (présence de taches sur au moins une bouture) des génotypes testés. Les résultats sont comparés à ceux des témoins sensibles et résistants.

### Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel statistique SAS. Une discrimination entre les plantes de type 3C et les plantes de type 4C est effectuée globalement avec des analyses discriminantes et par variable (analyse de variance) afin de détecter les caractères qui permettent de mieux différencier ces deux types de caféiers.

Des analyses en composantes principales sont réalisées pour étudier les dépendances entre les variables étudiées.

### Résultats

#### Niveau de ploïdie

L'étude du niveau de ploïdie des hybrides naturels permet d'évaluer (Jagoret, 1998)

et de classer du matériel végétal en deux groupes distincts, l'un de type 3C, contenant des hybrides triploïdes, l'autre de type 4C, constitué d'hybrides tétraploïdes (tableau 1).

L'histogramme des valeurs moyennes observées suggère cependant la présence de plusieurs hybrides aneuploïdes (hybrides dont le nombre de chromosomes est différent de 33 ou de 44) (figure 1).

#### Vigueur et développement végétatif

Le niveau de ploïdie influence fortement la vigueur et le développement végétatif des hybrides (tableau 2). L'analyse de variance montre une différence hautement significative ( $P < 0,0001$ ) entre les hybrides de type 3C et 4C pour l'accroissement du diamètre au collet entre un et deux ans, l'encombre-

**Figure 1.** Fréquence des hybrides par classe d'intensité de fluorescence (unité arbitraire).  
Hybrid frequency per fluorescence intensity category (arbitrary unit).

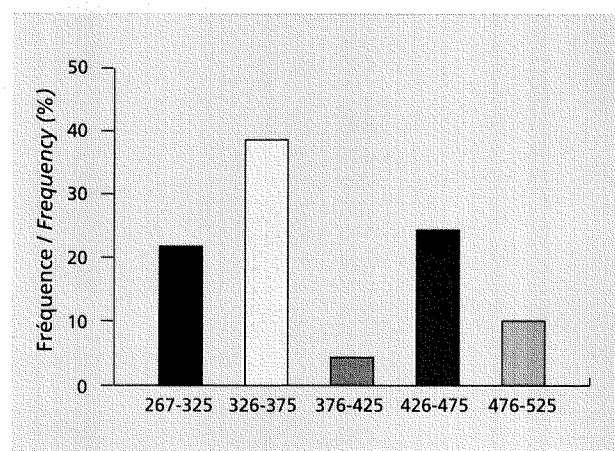




Tableau 1. Répartition des hybrides naturels par origine et par niveau de ploïdie.  
*Wild hybrid distribution by origin and by level of ploidy.*

| Origine<br>Origin | Nombre de<br>génotypes observés<br>Number of<br>genotypes observed | Niveau de ploïdie<br>Level of ploidy |    | Résistance à la rouille<br>Rust resistance |                         |                         |
|-------------------|--|--------------------------------------|----|--|-------------------------|-------------------------|
|                   |  | 3C                                   | 4C | Résistant<br>Resistant                     | Sensible<br>Susceptible | Non testé<br>Not tested |
| Canala            | 4  | 2                                    | 2  | 2  | 2                       | -                       |
| Kongouma          | 3  | 3                                    | -  | 2  | -                       | 1                       |
| Nakety            | 2  | -                                    | 2  | 2  | -                       | -                       |
| Coula             | 1  | 1                                    | -  | 1  | -                       | -                       |
| Goapin            | 4  | 1                                    | 3  | 1  | -                       | 3                       |
| Farino            | 14   | 3                                    | 11 | 11   | 2                       | 1                       |
| Pouembout         | 1  | 1                                    | -  | 1  | -                       | -                       |
| Nekliai           | 1  | 1                                    | -  | -  | -                       | 1                       |
| Moindou           | 1  | 1                                    | -  | 1  | -                       | -                       |
| Ny                | 9  | 8                                    | 1  | 9  | -                       | -                       |
| Neoua             | 1  | 1                                    | -  | 1  | -                       | -                       |
| Oueroupime        | 6  | 6                                    | -  | 6  | -                       | -                       |
| Konoe             | 11   | 10                                   | 1  | 10   | -                       | 1                       |
| Dogny             | 6  | 5                                    | 1  | 4  | 2                       | -                       |
| Bourail           | 1  | 1                                    | -  | 1  | -                       | -                       |
| Mechin            | 2  | 2                                    | -  | 2  | -                       | -                       |
| Pothe             | 10   | 2                                    | 8  | 7  | -                       | 3                       |
| Kokingone         | 1  | 1                                    | -  | 1  | -                       | -                       |
| Sarramea          | 6  | 6                                    | -  | 6  | -                       | -                       |
| Total             | 84   | 55                                   | 29 | 68   | 6                       | 10                      |

Tableau 2. Caractéristiques végétales et foliaires des hybrides naturels de caféiers par groupe de ploïdie.  
*Vegetative and leaf characteristics of wild coffee hybrids by ploidy group.*

| Hybrides<br>Hybrids                         | Variables          | Variables agronomiques / Agronomic variables                                 |  |   |  | Dimensions foliaires<br>Leaf dimensions |                            |
|---|--------------------|--|--|---|--|---|----------------------------|
|   |                    | Vigueur<br>entre<br>1 et 2 ans<br>Vigour<br>between 1<br>and 2 years<br>(cm) | Hauteur<br>à 2 ans<br>Height at<br>2 years<br>(cm) | Encombrement<br>au sol<br>Bulk at<br>ground level<br>(cm) | Longueur des<br>entre-nœuds<br>Internode<br>length<br>(cm) | Surface (Lxl)<br>Area (l x w)           | Forme (L/l)<br>Shape (l/w) |
|   |                    |  |  |   |  |   |                            |
| Type 3C                                     | Nombre<br>Number   | 53   | 54   | 54  | 54   | 54                                      | 54                         |
|   | Moyenne<br>Mean    | 4,1  | 156,3  | 198,3   | 4,4  | 79,1                                    | 2,5                        |
|   | Amplitude<br>Range | 2,3-5,7  | 96,0-197,3   | 151,0-235,7   | 3,5-5,7  | 48,5-141,6                              | 1,8-2,8                    |
|   | CV                 | 18,8   | 14,8   | 10,5  | 9,7  | 23,8                                    | 8,2                        |
| Type 4C                                     | Nombre<br>Number   | 29   | 30   | 30  | 30   | 30                                      | 30                         |
|   | Moyenne<br>Mean    | 3,2  | 114,5  | 164,2   | 4,2  | 71,7                                    | 2,1                        |
|   | Amplitude<br>Range | 1,3-4,7  | 73,3-156,8   | 96,0-227,0  | 2,9-5,4  | 42,8-108,8                              | 1,8-2,6                    |
|   | CV                 | 23,9   | 20,3   | 16,3  | 15,3   | 24,2                                    | 10,5                       |
| Témoins<br>Controls<br>Catimor<br>Sarchimor | Nombre<br>Number   | 4  | 4  | 4   | 4  | 4                                       | 4                          |
|   | Moyenne<br>Mean    | 2,0  | 79,6   | 116,2   | 2,6  | 70,1                                    | 2,3                        |
|   | Amplitude<br>Range | 1,7-2,8  | 72,0-92,0  | 99,8-141,7  | 2,1-3,3  | 51,9-80,6                               | 2,3-2,4                    |
|   | CV                 | 26,3   | 10,8   | 15,8  | 18,4   | 18,0                                    | 2,7                        |
| Témoin / Control<br>Coffea canephora        | Moyenne<br>Mean    | 3,1  | 125,8  | 142,8   | 4,2  | 103,1                                   | 2,7                        |

ment au sol et la hauteur à deux ans. Une différence significative ( $P = 0,0156$ ) entre les deux groupes d'hybrides est mise en évidence pour la longueur des entre-nœuds.

Quelle que soit la variable étudiée, le développement végétatif des hybrides de type 3C est supérieur à celui de tous les autres groupes de caféiers. Le développement végétatif des hybrides de type 4C est supérieur à celui des témoins Sarchimor, Catimor et *C. canephora*.

Les histogrammes de fréquences par classe des caractéristiques végétatives (figure 2) illustrent les différences observées entre les deux groupes d'hybrides.

Le niveau de ploïdie influence aussi les caractéristiques foliaires des hybrides naturels. L'analyse de variance met en évidence une différence hautement significative ( $P < 0,0001$ ) entre les deux groupes d'hybrides pour la forme de leurs feuilles. Les hybrides de type 3C sont caractérisés

par des feuilles plus lancéolées que les hybrides de type 4C (photo 2).

### Fertilité

La fertilité mâle et la fertilité femelle des hybrides dépendent du niveau de ploïdie (tableau 3). L'analyse de variance met en évidence une différence hautement significative ( $P < 0,0001$ ) entre les deux groupes d'hybrides pour le coefficient de remplissage, le taux de grains caracolis et la viabilité pollinique. Une différence significative ( $P = 0,0064$ ) est également mise en évidence pour le taux de loges vides.

Les histogrammes de fréquences par classe des caractéristiques biologiques (figure 3) illustrent les différences observées entre les deux groupes d'hybrides.

Les hybrides de type 4C présentent une fertilité femelle et une fertilité mâle meilleures que les hybrides de type 3C. Elles demeurent cependant, en moyenne, inférieures à celle des témoins Sarchimor, Catimor.

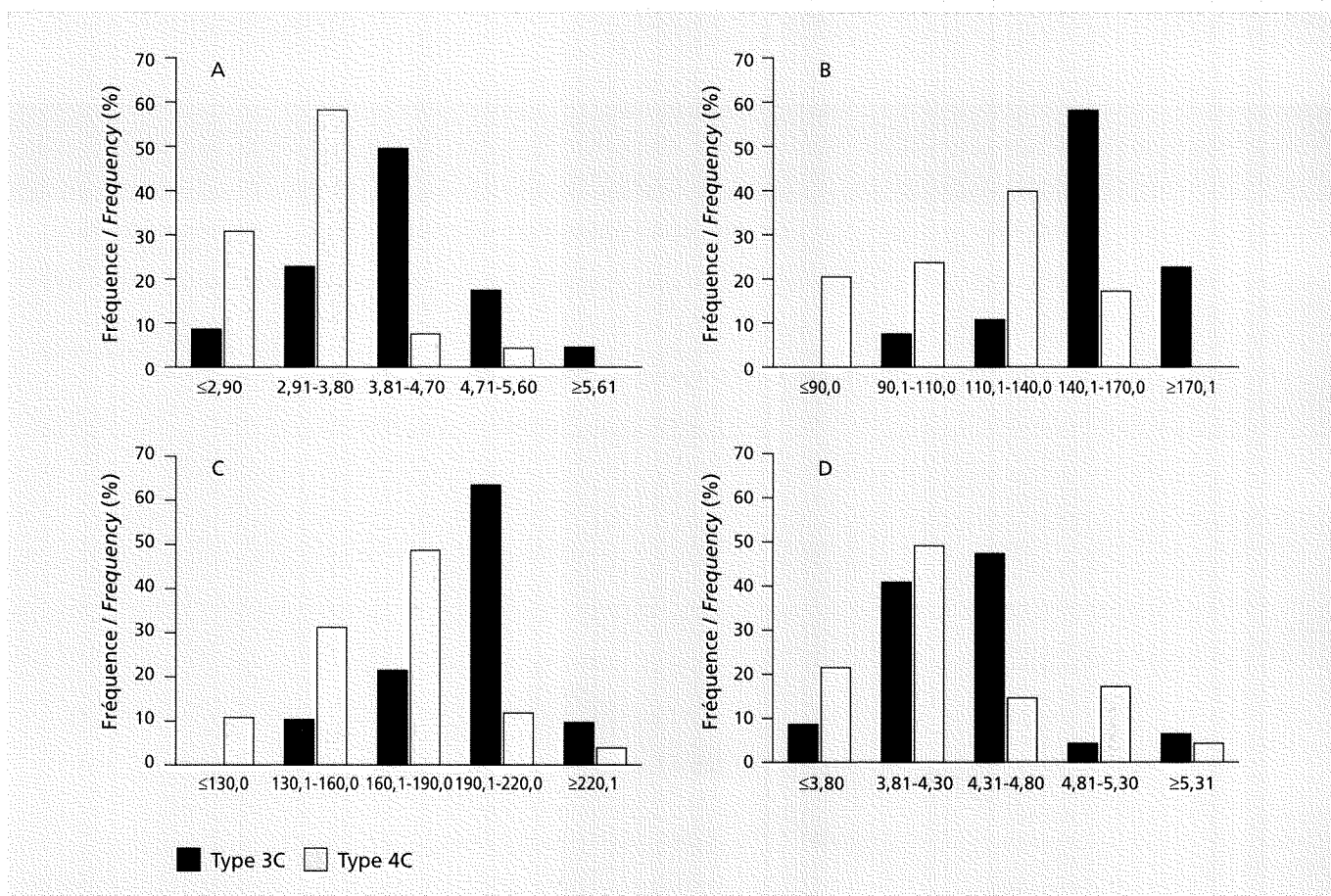
### Potentiel de production

Le niveau de ploïdie influence le potentiel de production des hybrides naturels (tableau 3). L'analyse de variance met en évidence une différence hautement significative ( $P < 0,0001$ ) entre les deux groupes d'hybrides pour la note moyenne de production calculée sur trois années.

Les notes moyennes de production des hybrides de type 4C sont dans l'ensemble supérieures à celles des hybrides de type 3C (figure 4). Elles restent toutefois inférieures à celle des témoins Sarchimor, Catimor et *C. canephora*.

### Résistance à *Hemileia vastratrix*

Parmi les 80 hybrides naturels testés, 74 ont fait l'objet d'une notation. La plupart d'entre eux, 68 dont 22 hybrides de type 4C, ont confirmé leur résistance à la race de rouille orangée présente en Nouvelle-Calédonie (tableau 1).



**Figure 2.** Caractéristiques végétatives des génotypes de type 3C et de type 4C obtenus par hybridation naturelle entre *C. arabica* et *C. canephora*. / Vegetative characteristics of type 3C and type 4C genotypes obtained by natural hybridization between *C. arabica* and *C. canephora*. A : Accroissement du diamètre au collet à deux ans (cm). / Girth increment at two years (cm). B : Hauteur à deux ans / Height at two years. C : Encombrement à deux ans / Bulk at two years (cm). D : Longueur des entre-nœuds / Internode length (cm).



Tableau 3. Fertilité et note de production des hybrides naturels de caféiers par groupe de ploïdie.  
*Fertility and production score of wild coffee hybrids by ploidy group.*

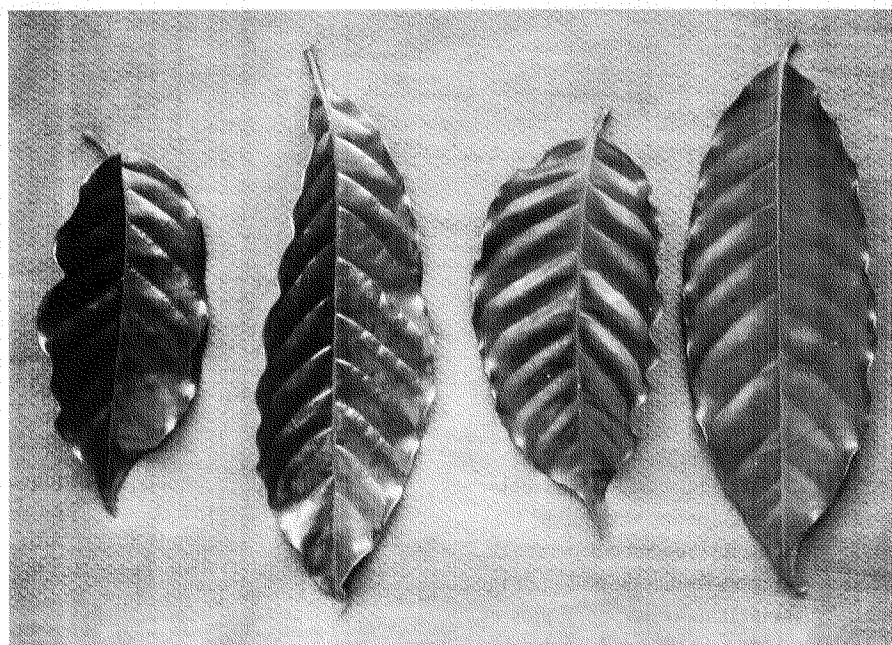
| Hybrides<br><i>Hybrids</i>                  | Variables                 | Fertilité femelle<br><i>Female fertility</i>             |                                      |  | Fertilité mâle<br><i>Male fertility</i>                 | Note de production<br><i>Production score</i> |
|---|---------------------------|--|--------------------------------------|--|---|---|
|   |                           | Coefficient de remplissage<br><i>Filling coefficient</i> | Loges vides<br><i>Empty cavities</i> | Grains caracolis<br><i>Pea berries</i> | Grains de pollen viables<br><i>Viable pollen grains</i> |   |
|   |                           |  | (%)                                  | (%)                                    | (%)   |   |
| Type 3C                                     | Nombre<br><i>Number</i>   | 53   | 53                                   | 53                                     | 53  | 54  |
|   | Moyenne<br><i>Mean</i>    | 0,6  | 26,7                                 | 83,5                                   | 21,8  | 1,4   |
|   | Amplitude<br><i>Range</i> | 0,1-1,1  | 5,2-51,1                             | 22,1-100,0                             | 2,8-71,2  | 1,0-3,5                                       |
|   | CV                        | 47,7   | 46,7                                 | 20,1                                   | 69,9  | 34,4  |
| Type 4C                                     | Nombre<br><i>Number</i>   | 30   | 30                                   | 30                                     | 30  | 30  |
|   | Moyenne<br><i>Mean</i>    | 1,0  | 19,3                                 | 51,5                                   | 46,0  | 2,5   |
|   | Amplitude<br><i>Range</i> | 0,5-1,4  | 0,4-42,5                             | 13,9-82,4                              | 14,3-84,0   | 1,0-3,3                                       |
|   | CV                        | 28,6   | 63,1                                 | 39,3                                   | 49,6  | 29,3  |
| Témoins<br><i>Controls</i>                  | Nombre<br><i>Number</i>   | 4  | 4                                    | 4                                      | 4   | 4   |
| Catimor                                     | Moyenne<br><i>Mean</i>    | 1,5  | 11,1                                 | 15,0                                   | 85,3  | 4,1   |
| Sarchimor                                   | Amplitude<br><i>Range</i> | 1,4-1,7  | 3,3-23,9                             | 4,0-37,7                               | 74,0-94,5   | 3,7-4,3                                       |
|   | CV                        | 10,4   | 81,5                                 | 102,0                                  | 12,2  | 7,2   |
| Témoin / Control<br><i>Coffea canephora</i> | Moyenne<br><i>Mean</i>    | -  | -                                    | -                                      | 76,3  | 3,0   |

## Analyse des corrélations intra-groupes

Pour l'ensemble des géotypes, l'Acp montre des corrélations significatives entre les variables végétatives et entre les variables biologiques (figure 5A).

Pour chaque groupe d'hybrides, elle met en évidence une corrélation intra-groupe hautement significative ( $P < 0,0001$ ) entre la vigueur, la hauteur et l'encombrement à deux ans (figures 5B et 5C). La corrélation hautement significative entre ces trois variables et la longueur des entre-nœuds observée pour les hybrides de type 4C ne l'est pas pour les hybrides de type 3C. Elle montre aussi une corrélation hautement significative ( $P < 0,0001$ ) entre le taux de remplissage des cerises, le taux de loges vides et le taux de grains caracolis.

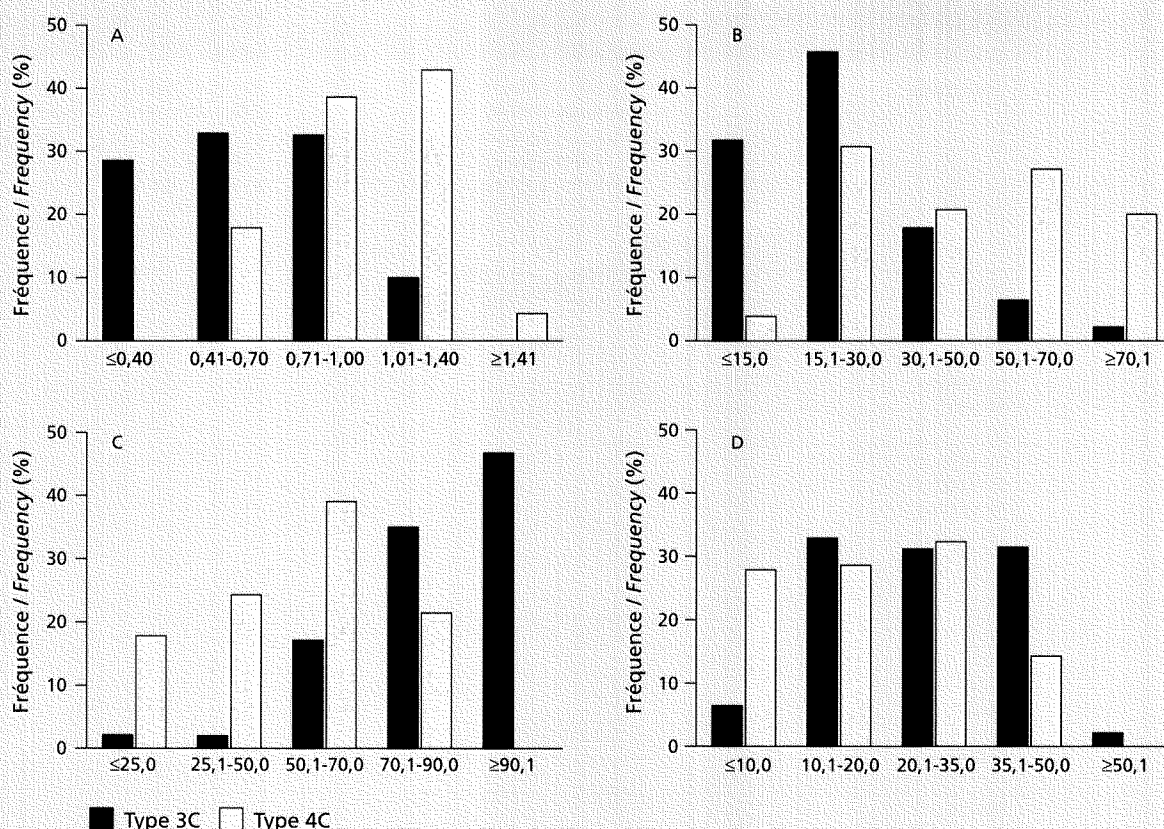
Une corrélation intra-groupe significative entre la note moyenne de production et la fertilité mâle est également mise en évidence pour les deux groupes d'hybrides. La relative indépendance observée dans les deux groupes entre les variables de vigueur et celles de productivité peut s'expliquer par la stérilité des hybrides naturels.



S. Lebegin

Photo 2. Les différentes formes de feuilles. / *Different leaf shapes.* De gauche à droite : caféier tétraploïde, caféier diploïde, hybride naturel de type 4C, hybride naturel de type 3C.  
*From left to right: tetraploid coffee tree, diploid coffee tree, type 4C wild hybrid, type 3C wild hybrid.*





**Figure 3.** Caractéristiques biologiques des génotypes de type 3C et de type 4C obtenus par hybridation naturelle entre *C. arabica* et *C. canephora*. / Biological characteristics of type 3C and type 4C genotypes obtained by natural hybridization between *C. arabica* and *C. canephora*.

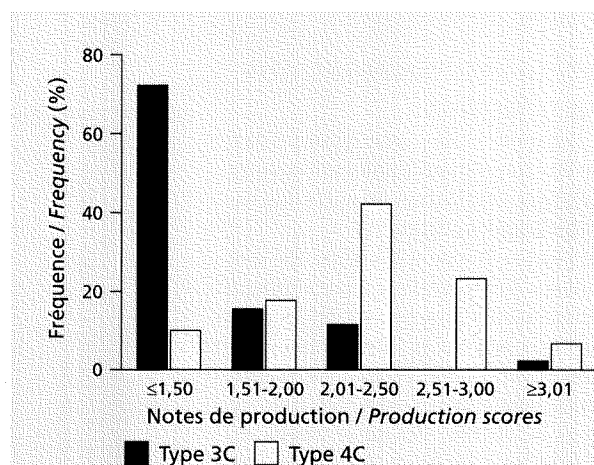
A : Coefficient de remplissage. / Filling coefficient.

B : Fertilité mâle. / Male fertility.

C : Taux de grains caracolis. / Proportion of pea berries.

D : Taux de loges vides. / Proportion of empty cavities.

**Figure 4.** Fréquence des hybrides par classe de notes de production. / Hybrid frequency per production score category.



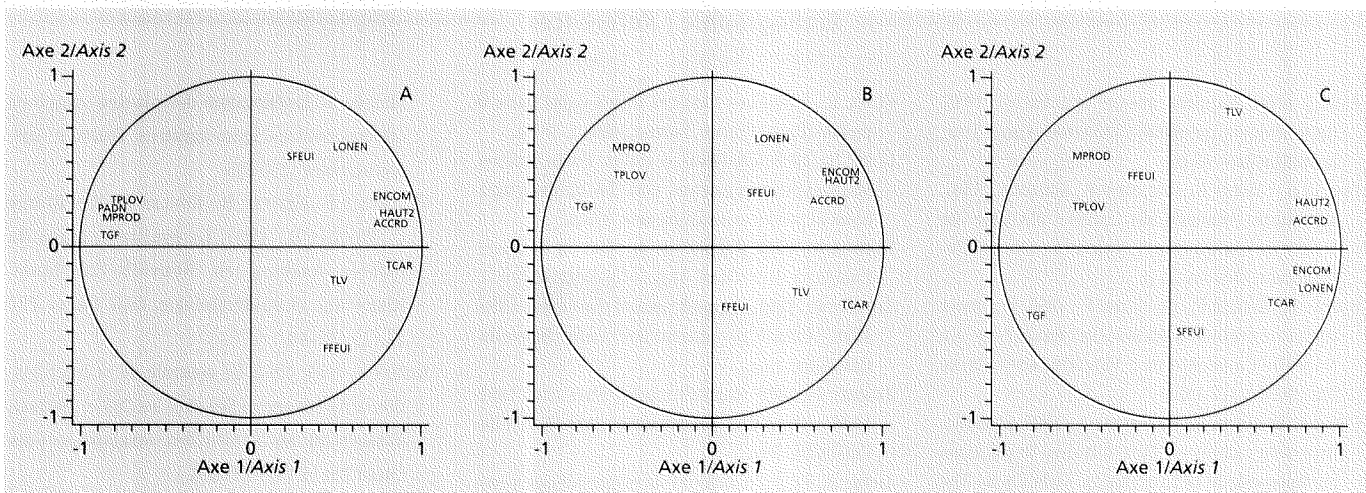
## Discussion et conclusion

L'évaluation conduite par le Cirad de 1993 à 1998 en Nouvelle-Calédonie a permis de préciser, à travers l'étude de plusieurs variables principalement agronomiques et biologiques, les caractéristiques des hybrides interspécifiques naturels collectés dans ce pays, et de montrer leur grande diversité.

Les deux tiers des génotypes étudiés sont des hybrides de type 3C, donc probablement issus de croisements directs entre *C. arabica* et *C. canephora*. Les autres hybrides sont de type 4C résultant, soit de croisements directs entre *C. arabica* et *C. canephora* rendus possibles par des températures assez basses qui ont entraîné une non-réduction des gamètes, soit de croisements de triploïdes avec des tétra-

ploïdes. Ils peuvent également provenir de rétrocroisements sur *C. arabica* ou d'auto-fécondations de tétraploïdes.

L'existence d'un grand nombre d'hybrides naturels de cafiers en Nouvelle-Calédonie confirme que ce type de croisement entre les deux espèces de cafiers est possible lorsque les conditions de milieu lui sont favorables. Elle infirme l'idée qui prévalait jusqu'à présent selon laquelle les



**Figure 5.** Relations entre caractères / Relations between characters.

A : Ensemble des génotypes. / All genotypes.

B : Hybrides de type 3C. / Type 3C hybrids.

C : Hybrides de type 4C. / Type 4C hybrids.

TPLOV : taux de pollen viable / proportion of viable pollen

ACCRD : accroissement du diamètre au collet entre 1 et 2 ans / girth increment between 1 and 2 years

HAUT2 : hauteur à deux ans / height at 2 years

ENCOM : encombrement à deux ans / bulk at 2 years

LONEN : longueur des entre-nœuds / internode length

SFEUI : surface foliaire / leaf area

FFEUI : forme foliaire / leaf shape

TCAR : taux de grains caracolis / proportion of pea berries

TLV : taux de loges vides / proportion of empty cavities

TGF : taux de grains formés / proportion of normal beans

MPROD : note moyenne de production / mean production score

PADN : niveau de ploïdie / level of ploidy

croisements spontanés entre *C. arabica* et *C. canephora*, tétraploïdes à l'instar de l'Hybride de Timor, sont très rares.

Cette étude met également en évidence l'influence prépondérante du niveau de ploïdie sur la fertilité mâle et la fertilité femelle des hybrides naturels, ainsi que leur grande variabilité pour les critères étudiés. Sur l'ensemble des arbres, la liaison entre fertilité et productivité est claire. Des études complémentaires s'avèrent cependant nécessaires pour mieux comprendre l'influence de chaque composante de la fertilité sur la productivité des hybrides.

Si la corrélation entre la production et la fertilité mâle des hybrides est confirmée, cette dernière pourrait alors être utilisée comme critère précoce d'évaluation du potentiel de production.

Les hybrides de type 3C présentent un faible potentiel de production qui varie cependant largement d'un génotype à l'autre, et qui semble plus lié à la viabilité pollinique des hybrides qu'à leur fertilité femelle. Les hybrides de type 4C s'avèrent significativement plus fertiles et plus productifs que les hybrides de type 3C, et

présentent moins de variations malgré une vigueur légèrement inférieure. Ils sont toutefois moins performants que les témoins de *C. arabica* et de *C. canephora* auxquels ils sont comparés, ce qui exclut toute utilisation directe de ce type de matériel végétal.

En revanche, compte tenu de leur résistance à *Hemileia vastatrix*, les hybrides interspécifiques de Nouvelle-Calédonie peuvent présenter un intérêt à moyen et à long terme dans le cadre de programmes d'amélioration de *C. arabica* par transfert de leur résistance à la rouille. Bien que d'une durée très longue (25-30 ans), un tel programme permettrait d'élargir la base génétique des variétés de cafiers actuellement diffusées dans les pays producteurs. Cette opportunité doit être néanmoins validée par des tests complémentaires visant à confirmer leur résistance aux autres races de rouille sévissant dans le monde et à d'autres maladies telles que l'antracnose, ou à des parasites comme les nématodes. De plus, le taux d'autofécondation de chaque hybride doit être préalablement confirmé afin de préciser les méthodes pos-

sibles d'amélioration : autofécondation ou rétrocroisement.

Enfin, la classification de ce matériel végétal en deux groupes distincts demeure peu précise compte tenu des limites de la technique utilisée.

La cytométrie en flux ne permet en effet que le comptage de cellules présentant une intensité de fluorescence donnée, la quantité d'ADN contenue dans les cellules étant proportionnelle à cette dernière. Les résultats obtenus doivent donc être confirmés par des comptages de chromosomes afin d'éliminer les biais dus aux différences de taille des chromosomes de *C. arabica* et de *C. canephora*, et de mieux identifier les hybrides aneuploïdes. ■

#### Remerciements

Les auteurs tiennent à exprimer leur gratitude à C. Carasco-Lacombe, M. Dufour, N. Ferrière, et I. Jourdan, pour leur disponibilité et leur aide lors des analyses de cytométrie et de l'interprétation des résultats.



## Bibliographie / References

- ANON., 1986. Rapport annuel d'activités 1985. Ponérihouen, Nouvelle-Calédonie, Cirad-Ircc, opération café, 53 p.
- BOCCAS B., SEIVERT B., PELLEGRIN F., KOHLER F., 1981. La rouille orangée du caféier d'Arabie en Nouvelle-Calédonie. Nouméa, Nouvelle-Calédonie, Orstom, 31 p.
- BOCCAS B., KOLHER F., PELLEGRIN F., 1985. Les races physiologiques d'*Hemileia vastatrix* en Nouvelle-Calédonie et à Vanuatu. Café Cacao Thé 29 (3) : 177-182.
- CAPOT J., DUPAUTEX B., DURANDEAU A., 1968. L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire. Duplication chromosomique et hybridation. Café Cacao Thé 12 (2) : 114-125.
- CHARMETANT P., LE PIERRES D., 1991. Rapport de mission en Nouvelle-Calédonie : prospection et collecte d'hybrides naturels de caféiers cultivés. Ircc-Cirad/Orstom, 21 p.
- CHARRIER A., JACQUOT M., HAMON S., NICOLAS D., 1997. L'amélioration des plantes tropicales. Coll. Repères, Montpellier, France, Cirad-Orstom, 623 p.
- COSTE R., 1955. Les caféiers et les cafés dans le monde. Paris, France, Larose, tome 1, 381 p.
- COSTE R., 1989. C8a caféiers et cafés. Paris, France, Maisonneuve et Larose, coll. Techniques agricoles et productions tropicales, 373 p.
- ESKES A.B., 1990. Rapport de mission en Nouvelle-Calédonie. Ircc-Cirad, 13 p.
- JAGORET P., 1997. Rapport annuel d'activités 1995-1996. Cirad-Cp, programme café Nouvelle-Calédonie, 84 p.
- JAGORET P., 1998. Rapport annuel d'activités 1997-1998. Cirad-Cp, programme café Nouvelle-Calédonie, 78 p.
- JAHER J., 1992. Techniques de cytogénétique végétale. Paris, France, coll. Techniques et Pratiques, 183 p.
- LANAUD C., 1983. Phénomènes de non-réduction provoqués par le froid au cours de la microsporogénèse du caféier. Café Cacao Thé 27 (4) : 259-270.
- OLLITRAULT P., MICHAUX-FERRIÈRE N., 1992. Etude critique de la technique de cytométrie en flux appliquée à l'amélioration des plantes : résultats obtenus pour quelques agrumes. Fruits, n° spécial agrumes : 195-203.
- PELLEGRIN F., SEIVERT B., KOHLER F., VAN BERCIE C., BOCCAS B., 1983. La rouille orangée du caféier Arabica en Nouvelle-Calédonie. Historique et épidémiologie. Café Cacao Thé 27 (1) : 27-40.
- REFFYE P. (DE), 1974. Le contrôle de la fructification et de ses anomalies chez les *Coffea arabica*, *Robusta* et leurs hybrides « arabusta ». Café Cacao Thé 18 (4) : 237-253.
- RISBEC J., 1930. Le café en Nouvelle-Calédonie. L'Agronomie coloniale (154) : 97-147.
- SAUSSOL A., 1967. Le café en Nouvelle-Calédonie. Grandeur et vicissitude d'une colonisation. Les Cahiers d'Outre-Mer, XX : 275-305.
- TERCINIER G., 1958. Caféiculture et sols de Nouvelle-Calédonie. Paris, France, Orstom, 20 p.

# Characterization and evaluation of wild coffee hybrids in New Caledonia

Jagoret P., Cilas C., Eskes A., Charmetant P.

CIRAD-CP, TA 80/PS1, avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Coffee has been produced in New Caledonia since the end of the 19th century. The first coffee species, introduced in 1856, was *C. arabica*, but its extension ceased as of 1908, when leaf rust due to *Hemileia vastatrix* appeared on the island (Saussol, 1967). The varieties distributed at the time—Typica, Laurina (Bourbon Pointu) and Mokka (Leroy) (Coste, 1955; Saussol, 1967)—were susceptible to the disease, and were gradually replaced by trees of the species *C. canephora*, variety Kouillou, imported from France in 1910, and variety Robusta, imported from Java in 1912 (Risbec, 1930).

However, natural selection due to the genetic heterogeneity of the plants prevented *C. arabica* from disappearing altogether (Boccas *et al.*, 1981; Pellegrin *et al.*, 1983). Producers were able to keep some of their coffee trees (Tercinier, 1958; Saussol, 1967), which probably stemmed from the Typica and Bourbon varieties (Eskes, 1990). The mixed plantings obtained favoured wild crosses between the two species, a phenomenon that is rare but had already been observed in other countries whether wild tetraploid hybrids such as the Timor hybrid were seen in the 1950s and subsequently widely used to improve *C. arabica* (Coste, 1989; Charrier *et al.*, 1997).

Artificial hybridization of *C. arabica* (44 chromosomes) and *C. canephora* (22 chromosomes) is possible using *C. arabica* as the female parent. It results in triploid hybrids (33 chromosomes) which are vigorous but almost totally sterile. Tetraploid hybrids have nevertheless been obtained and planted, such as the Arabusta in Côte d'Ivoire, by artificially duplicating the number of chromosomes of *C. canephora* and then carrying out interspecific crosses (Capot *et al.*, 1968). Natural chromosome duplication is also possible by cold-treating coffee pollen mother cells (Lanaud, 1983).

The appearance of wild interspecific hybrids in New Caledonia was favoured by the local ecosystem—cultivation under shade, permanently damp conditions in the valleys of the central range, lack of upkeep—resulting from the specific climatic and human conditions in the archipelago: a more marked cold season on the west coast and a lack of interest in coffee growing amongst producers.

The combination of these factors enabled the growth and reproduction of hybrids obtained naturally, whose characteristics of good rust resistance and high vigour but poor yields did not escape the attention of producers, who dubbed them "half-caste coffees".

In view of the possible scientific merits of this type of planting material, CIRAD began collecting in 1985 (Anon., 1986) and, in association with ORSTOM (since renamed IRD), it conducted a survey in 1991 (Charmetant and Le Pierres, 1991). In 1993, after propagating the hybrids through cuttings, the programme resulted in a collection of 84 genotypes at the Pocquereux station. The agronomic and biological characteristics of the genotypes were evaluated until 1998.

## Material and methods

### Planting material

Wild hybrids of cultivated coffee trees were collected from old plantings, primarily set up between the wars, where *C. arabica* was mixed with *C. canephora*. They came from 19 geographical zones, primarily in the central region of New Caledonia, where conditions are more propitious to the appearance of interspecific hybrids than in the North (where there is no *C. arabica*) and South (no *C. canephora*) (see map). The hybrids were compared with five controls: a Sarchimor variety (1668), three Catimor varieties (F5, F6 and 1702), and a *C. canephora* clone (Jagoret, 1997).

### Field trials

The Pocquereux station is located on the west, leeward coast of New Caledonia, 166° 53' East and 21° 44' South, at a height of 38 m above sea level, and consequently suffers from a regular rainfall deficit, with under 1 200 mm of rain a year, which means irrigating during the dry season. The soils are silty clays and the coffee trees thus had to be planted on ridges. They have a high magnesium content and are highly acid (water pH = 5), with a severe potassium and phosphorus deficiency. Inorganic fertilizers were applied in the coffee plantings twice yearly, using rates calculated by a soil diagnosis software.

Each genotype was represented by a row of four to six plants. The coffee planting density was 2 500 plants per hectare, and the trees were

left to grow freely, without shade, with two stems per plant.

## Observations

The number of plants observed per genotype varied from one to six depending on the number originally planted and the mortality rate over the previous two years. The level of ploidy, vegetative development, fertility, production potential and resistance to *Hemileia vastatrix* were observed for the whole of the collection.

### Level of ploidy

The level of ploidy was estimated by flow cytometry, ie by fluorescence intensity, which is proportional to the amount of DNA in the cells (Ollitrault and Michaux-Ferrière, 1992). The measurements were made in the INSERM laboratory in Montpellier. The interspecific hybrids were compared with two controls: CAN 126 (diploid) and KF2.1 (tetraploid).

### Vigour and vegetative growth

To estimate wild hybrid growth, trunk girth was measured at one and two years, 10 cm from the ground, and girth increment between one and two years was deduced.

Vegetative development was evaluated by measuring the tallest stem and a plagiotropic primary branch on which the number of nodes was counted so as to calculate internode length.

Bulk was assessed by measuring canopy diameter at two years.

Lastly, the width (w) and length (l) of 30 leaves per genotype were measured to estimate their area (l x w) and determine their shape (l/w).

### Fertility

Fertility was studied under natural pollination conditions. Although the success rate for selfing was not known for all the hybrids, it varied between 0 and 95%, which is comparable to the success rate for open pollination.

The female fertility of each genotype was estimated by cutting 100 to 120 unripe cherries and classifying them according to their contents (Reffye, 1974) (photo 1). The filling coefficient, or number of beans per cherry, proportion of empty cavities and proportion of pea berries in relation to the number of beans formed were calculated.



Male fertility was estimated by counting and classifying at least 30 pollen grains per genotype, after staining with Alexander blue. When placed on slides, fertile pollen showed up as purplish-red and sterile pollen as green (Jahier, 1992).

### Production potential

The production of trees of different genotypes was graded individually from 1996 to 1998. The score given ranged from 0 (no fruit on the tree) to 5 (very high-yielding tree).

### Resistance to *Hemileia vastatrix*

In conjunction with ORSTOM, wild hybrid resistance to the *Hemileia vastatrix* strain found in New Caledonia (Boccas *et al.*, 1985) was observed in June and July 1996, when disease incidence was highest.

Three plagiotropic cuttings per hybrid, each with two pairs of leaves, were placed in a confined environment in three shaded cutting boxes, each corresponding to a replicate. The leaves were inoculated by rubbing the underside with leaves bearing patches of leaf rust, freshly collected from Arabica coffee plantings, and spraying to moisten them. After inoculation, the plant material was kept for four days in total darkness at 100% relative humidity to foster uredospore germination.

The reactions were analysed six weeks later, and confirmed the resistance (no patches of leaf rust on any of the three cuttings) or susceptibility (patches on at least one cutting) of the genotypes tested. The results were compared to those for susceptible and resistant controls.

### Statistical analyses

Statistical analyses were done using the SAS software. Type 3C plants were distinguished from type 4C plants through discriminant analyses and through variables (analysis of variance) so as to detect characters that could be used to distinguish more clearly between these two types of coffee trees.

Principal component analyses were carried out to study dependence between the study variables.

## Results

### Level of ploidy

Studying wild hybrid ploidy enabled the evaluation (Jagoret, 1998) and classification of the planting material into two distinct groups, one of type 3C plants, containing triploid hybrids, and the other of type 4C plants, comprising tetraploid hybrids (table 1).

However, the histogram of the mean values observed suggests that there were several aneuploid hybrids (hybrids with neither 33 nor 44 chromosomes) (figure 1).

### Vigour and vegetative development

The level of ploidy significantly influenced the vigour and vegetative development of the hybrids (table 2). The analysis of variance revealed a highly significant difference ( $P < 0.0001$ ) between type 3C and type 4C hybrids for trunk girth increment between one and two years, bulk at ground level and height at two years. There was also a significant difference ( $P = 0.0156$ ) between the two groups of hybrids for internode length.

Irrespective of the variable studied, the vegetative growth of type 3C hybrids was greater than that of all other groups of coffee trees. That of type 4C hybrids was greater than that of the Sarchimor, Catimor and *C. canephora* controls.

The histograms of vegetative characteristic frequency per category (figure 2) illustrate the differences seen between the two hybrid groups.

The level of ploidy also affected the leaf characteristics of wild hybrids. An analysis of variance revealed a highly significant difference ( $P < 0.0001$ ) between the two hybrid groups for leaf shape. Type 3C hybrids were characterized by more spear-shaped leaves than type 4C hybrids (photo 2).

### Fertility

The male and female fertility of the hybrids depended on the level of ploidy (table 3). An analysis of variance revealed a highly significant difference ( $P < 0.0001$ ) between the two hybrid groups for the filling rate, proportion of pea berries and pollen viability. There was also a significant difference ( $P = 0.0064$ ) for the proportion of empty cavities.

The histograms of biological characteristic frequency (figure 3) illustrate the differences observed between the two hybrid groups.

The male and female fertility of type 4C hybrids proved better than that of type 3C hybrids. However, it was still lower, on average, than that of the Sarchimor and Catimor controls.

### Production potential

The level of ploidy affected the production potential of wild hybrids (table 3). An analysis of variance revealed a highly significant difference ( $P < 0.0001$ ) between the two hybrid groups for the average production score over three years.

The average production scores for type 4C hybrids were generally higher than those for type 3C hybrids (figure 4). However, they were still lower than those for the Sarchimor, Catimor and *C. canephora* controls.

### Resistance to *Hemileia vastatrix*

Of the 80 wild hybrids tested, 74 were given scores. Most of them—68 including 22 type 4C hybrids—confirmed their resistance to the leaf rust strain found in New Caledonia (table 1).

### Analysis of within-group correlations

For the genotypes as a whole, PCA revealed significant correlations between the vegetative variables and between the biological variables (figure 5A).

For each hybrid group, it demonstrated a highly significant within-group correlation ( $P < 0.0001$ ) between vigour, height and bulk at two years (figures 5B and 5C). However, the highly significant correlation between these three variables and internode length seen for type 4C hybrids was not seen for type 3C hybrids. It also revealed a highly significant correlation ( $P < 0.0001$ ) between the cherry filling rate, the proportion of empty cavities and the proportion of pea berries.

There was also a significant within-group correlation between the average production score and male fertility for the two hybrid groups. The relative independence of vigour and productivity variables in the two groups can be put down to the sterility of wild hybrids.

## Discussion and conclusion

Through a study of several primarily agronomic and biological variables, the programme carried out by CIRAD in New Caledonia from 1993 to 1998 determined the characteristics of the wild interspecific hybrids collected there, and revealed their significant diversity.

Two thirds of the genotypes studied were type 3C hybrids, thus probably resulted from direct crosses between *C. arabica* and *C. canephora*. The others were type 4C hybrids resulting either from direct crosses between *C. arabica* and *C. canephora* made possible by quite low temperatures and the subsequent non-reduction of gametes, or from crosses between triploids and tetraploids. They may also have been backcrosses onto *C. arabica* or tetraploid selfs.

The existence of a large number of wild hybrids in New Caledonia proves that this type of cross between the two coffee species is possible provided environmental conditions are favourable. It disproves the previous belief that wild hybrids between *C. arabica* and *C. canephora*, tetraploids like the Timor hybrid, were very rare.

The study also revealed the crucial influence of the level of ploidy on the male and female fertility of wild hybrids, and their substantial variability in terms of the study criteria. There was a clear link between fertility and productivity for the trees studied. However, additional studies

are required in order to explain the effect of each fertility component on hybrid productivity.

If the correlation between the productivity and male fertility of the hybrids is confirmed, male fertility could be used as a criterion for the early evaluation of production potential.

Type 3C hybrids have a low production potential, although it varies widely from one genotype to another and is apparently linked more to the pollen variability of the hybrids than to their female fertility. Type 4C hybrids are significantly more fertile and more productive than type 3C hybrids, and vary less, despite their slightly poorer vigour. However, they perform less well than the *C. arabica* and de *C. canephora* controls with which they were compared in our study, which rules out any direct use of this type of planting material.

On the other hand, given their resistance to *Hemileia vastatrix*, New Caledonian interspecific hybrids could be of interest in the medium and long term for programmes aimed at improving *C. arabica* by transferring their rust resistance. Although such programmes take a long time (25-30 years), they would help to broaden the genetic base of the coffee varieties currently distributed in producing countries. However, their merits need to be validated by further tests to confirm their resistance to other rust strains found worldwide and other diseases such as coffee berry disease or parasites such as nematodes. Moreover, the selfing rate of each hybrid will have to be confirmed beforehand so as to determine the possible improvement method: selfing or backcrossing.

Lastly, the classification of this planting material into two distinct groups is still relatively imprecise, due to the limitations of the technique used.

In effect, flow cytometry only counts the cells with a given fluorescence intensity, as the amount of DNA in the cells is proportional to that intensity. The results obtained thus need to be confirmed by counting chromosomes, so as to eliminate the bias due to the difference in chromosome size between *C. arabica* and *C. canephora*, and to better identify aneuploid hybrids. ■

#### Acknowledgements

The authors wish to thank C. Carasco-Lacombe, M. Dufour, N. Ferrière and J. Jouan for their help with cytometry analyses and result interpretation.